

Szintetikus és NMR kutatások peptidek és szénhidrátok körében.....

A kutatás időtartama: 2001 – 2005.

### **Bevezetés**

Több, mint 5 évvel ezelőtt benyújtott kutatási munkatervünkben több altémát jelöltünk meg peptidek illetve szénhidrátok területén, amelyek egyrészt új típusú, várhatóan biológiai aktivitással bíró mimetikumok szintézisét, másrészt ezen vegyületek, valamint hasonló természetes, ill. félszintetikus származékok szerkezetének, ill. térszerkezetének meghatározását tűzték ki célul. A szerkezetvizsgálatok túlnyomó többségét a biológiai rendszereket közelítő folyadékfázisban terveztük, és végeztük is el, fő vizsgálati módszerként a nagyfelbontású, többdimenziós, multinukleáris NMR spektroszkópia alkalmazásával. Ez a közelítés magában foglalta a legmegfelelőbb NMR technikák kiválasztását, ill. azok továbbfejlesztését is. A megjelölt két vegyületcsoport között az összekötő kapcsot a bakteriális sejtfalból izolált, ill. félszintetikus úton módosított peptidoglikán fragmensek képezték, amelyek egyikének oldatkonformációját NMR- és molekulamodellezési módszerekkel korábban behatóan vizsgáltunk (Matter, H; **Szilágyi, L**; Forgó, P; Marinic, Z; Klaic, B: *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 2212 (1997)).

Az eredetileg 4 évre tervezett kutatás időtartamát a KM2 zsűri elnökének hozzájárulásával 1 évvel meghosszabbítottuk. Egyrészt a hosszú időtartam miatt, másrészt a kutatómunka természetének velejárójaként (nem várt nehézségek, új szempont felbukkanása, nem tervezhető új felismerések, eredmények, stb.) az eredetileg kitűzött program bizonyos módosításokat szenvedett, ezekre az egyes alpontok tárgyalásánál konkrétan ki fogok térni.

### ***Peptidek konformációjának és kölcsönhatásainak NMR vizsgálata oldatfázisban***

Vizsgálni kívántuk a *humán pankreász ribonukleáz (RNáz)* fehérje – melynek szerkezet-meghatározásában részt vettünk (El-Joubary,A; Bruix,M; Santoro,J; Cafaro,V; Scognamiglio,R; Di Donato,A; D'Alessio,G; **Kövér,KE**; Batta,Gy; **Szilágyi,L**; Rico,M *J. Biomol. NMR* **15**, 265 (1999)). -- belső- és globális reorientációs mozgásait modern, többdimenziós NMR technikák segítségével. Újabb izotópjelzett minta, amelyre méréseinkhez szükségünk lett volna, azonban nem készült D'Alessio professzor

laboratóriumában (Nápolyi Egyetem) mivel erre irányuló EU- és egyéb pályázataink nem nyertek támogatást. Ezért az  $^{15}\text{N}$ -izotópjelzett ubikvitin fehérje és a trehalóz diszacharid példáján bemutatva javasoltuk a Lipari-Szabó féle NMR relaxációs dinamikai módszer kiterjesztését. Igazoltuk, hogy a  $T_1$ ,  $T_2$ , NOE, longitudinális és transzverzális kereszt-korrelációs relaxáció mérésével a szokásos dinamikai paramétereken felül meghatározható a kémiai eltolódás anizotrópiája (CSA) és a geometriai faktor is [2]. A CSA/DD kereszt-korrelációs relaxáció mérésére új, kis és nagy molekulák vizsgálatára egyaránt alkalmas módszereket dolgoztunk ki. Új TROSY módszert javasoltunk fehérjékben a szekunder struktúrára jellemző NH-H $\alpha$  homonukleáris csatolási állandók mérésére [3]. A módszer érzékenysége adatgyűjtés alatti sávselektív H $\alpha$ -proton lecsatolással szükség esetén tovább növelhető.

A másik tervezett peptid témában Lovas Sándor prof. (Omaha, Nebraska, USA) csoportjával együttműködve vizsgáltuk az aromás gyűrűk és a peptid amid-hidrogének közötti kölcsönhatást helikális modell peptidekben. Laboratóriumunk az NMR méréseket és azok kiértékelését, az amerikai csoport a molekuladinamikai számításokat végezte. Megállapítottuk, hogy az említett kölcsönhatások gyakoriak helikális térszerkezetű peptidekben és egyéb gyenge kölcsönhatásokkal együtt a szerkezetet stabilizálják [11].

Bakteriális endotoxinok (lipopoliszaccharidok, LPS) káros hatását egyes peptidek az LPS-hez kötődve gátolják. Az egyik LPS-gátló peptid a szintetikus úton előállított LALF-14 (Limulus anti-LPS factor) hexadekapeptid, amely a teljes LALF (Limulus anti-LPS factor) protein lipid-A-kötő szekvenciáját tartalmazza. A Ljubljana-i Nemzeti Kémiai Intézet NMR- és molekulamodellezési csoportjával együttműködve tanulmányoztuk az LPS/LALF-14 kölcsönhatást. A kooperáció mobilitási költségeihez egy Tét pályázat keretében kapunk támogatást. Elvégeztük a LALF-14 teljes NMR jelhozzárendelését lipid-A-hoz kötött állapotban, majd csere-átviteli 2D NOE módszerrel számos távolság-kényszerfeltételt határoztunk meg. Partnereink ezen kísérleti adatokat felhasználva molekuladinamikai és dokkolási számításai segítségével meghatározták a lipid-A-hoz kötött peptid konformációját. Bár a teljes LALF protein lipid-A-kötő szegmensére jellemző  $\beta$ -lemez másodlagos szerkezet nem található meg a LALF-14-ben sem szabad, sem kötött állapotban, a dokkolási számítások azt mutatták, hogy ez a szerkezeti elem nem előfeltétele a LALF protein LPS-hez történő kötődésének [12].

A Bevezetésben idézett korábbi cikkünkben kimutattuk, hogy a *Brevibacterium divaricatum* sejtfal peptidoglikán ismétlődő egysége, amely egy diszaccharid-pentapeptid (peptidoglikán-monomer, PGM), vizes oldatban olyan konformációt vesz fel, amely a molekulának amfifil jellegét kölcsönöz: a molekula hidrofil- és lipofil felületei jól elkülönülnek. A molekula markáns immunomoduláns hatással bír: ebben a lipofil jelleg szerepet játszhat a gazdasejek membránjával való kölcsönhatás során. E kérdés további vizsgálatához együttműködő partnereink a zágrábi Immunológiai Intézetben félszintetikus úton két lipofil származékot állítottak elő (BocTyrPGM és AdGlyPGM). E származékok konformációját 2D NMR módszerek és molekulamodellézési számítások segítségével tanulmányoztuk. Elvégeztük mindhárom glikopeptid teljes, önkonzisztens  $^1\text{H}$ - és  $^{13}\text{C}$  jelhozzárendelését. DMSO oldószerben. NOESY- ill. ROESY kísérletekkel mintegy 130  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -távolságfeltételt határoztunk meg, és a konformációs preferenciákat erre alapozott távolság-geometriai számításokkal határoztuk meg. Kimutattuk, hogy a lipofil szubsztituensek megváltoztatják a peptid-komponens konformációját a természetes alapvegyületéhez (PGM) képest, ezen konformációs különbségek azonban a lipofil származékok biológiai aktivitását (immunmoduláció, enzimkötődés) lényegesen nem befolyásolják [6].

#### ***Bioaktív szénhidrátok analogonjainak szintézise és szerkezetvizsgálata.***

Ismeretesek oligoszacharidok olyan heteroanalogonjai, melyekben az interglikozidos oxigént más atomok (N, S, Se, C) helyettesítik. Kevés példa van azonban olyan szerkezetekre, amelyekben a monoszacharid komponenseket két heteroatomot tartalmazó *háromkötéses híd* (3KGLH) kapcsolja össze. Egy ilyen típus a diszulfid kötés, mely szerkezeti elem jól ismert peptidek és fehérjék körében, szénhidrátok területén azonban gyakorlatilag ismeretlen volt. Előállítottunk ezért olyan diszacharid-mimetikumokat, melyekben két különböző monoszacharid-egységet egy diszulfid interglikozidos kötés kapcsol össze [1]. Előzetes vizsgálatokban tanulmányoztuk e származékok konformációs sajátosságait ill. szénhidrát-kötő enzimekkel való kölcsönhatásaikat. Az egyik új diglikozil-diszulfid származék az N-acetil-glükózaminidáz enzimet kompetitív mechanizmus szerint gátolja közepes erősséggel [nem közölt eredmények].

3KGLH származékok térszerkezetét gyengén orientált folyadékkristályos fázisban is terveztük vizsgálni. Az ilyen körülmények közt NMR módszerrel mérhető ún. maradék dipoláris csatolási állandók további értékes információt szolgáltatnának e molekulák térszerkezetéről. Ez a megközelítés különösen diglikozil-diszulfid származékok térszerkezetének meghatározásában játszhat fontos szerepet. Ennek előkészítésére 2D NMR módszereket fejlesztettünk ki, amelyek a maradék dipoláris csatolások mérését a lényegesen pontosabbá és érzékenyebbé teszik [7]. A módszer korábbiaknál nagyobb felbontóképességét a távolható heteronukleáris csatolások lecsatolása révén értük el a  $t_1$  evolúciós idő közepén G-BIRD<sup>r</sup> impulzus alkalmazásával. Fehérjék esetén a hasonlóképpen módosított G-BIRD<sup>r</sup>-TROSY kísérletet javasoltuk és alkalmaztuk a maradék dipoláris csatolások pontos mérésére.

Szénhidrátokban a láncvégi metilén-csoportok diasztereotóp protonjainak skaláris és dipoláris csatolásai fontos szerkezeti és dinamikai információkat közvetítenek. Új NMR módszert közöltünk ezen protonok egykötéses proton-szén-, ill. a kétkötéses proton-proton csatolásaihoz tartozó dipoláris járulékok meghatározására [10]. A mért és számított egykötéses proton-szén maradék-dipoláris csatolások (RDC) összevetésével a metilén-hidrogének sztereospecifikus hozzárendelése is megadható.

A *szulfénamid*-kötés a 3KGLH-származékok újabb típusát képviseli. Ezen kötéstípus gyakorlatilag szintén ismeretlen volt szénhidrátok körében. Kidolgoztunk két általános módszert S-glikozil-N-aril-, S-glikozil-N-alkil- illetve S-glikozil-N-aralkil szulfénamidok szintézisére [9]. E módszerek kiterjesztésével lehetőség nyílik a calicheamicin daganatgátló antibiotikumok oligoszacharid részében a hidroxilamin típusú interglikozidos kötés szulfénamidra történő cseréjére.

A gyűrűs aminoguanidinnek tekinthető 2-hidrazino-4-oxo-6-metil-pirimidin reakciója aldehidekkel hidrazonokat eredményez, amelyek acilezési körülmények között gyűrűt zárnak. Aldehidként egyszerű monoszacharidokat alkalmazva nyílt láncú *nukleozid analogon* származékok állíthatók elő. Modellvegyületként egyszerű aromás aldehidekkel végzett reakciók 3-szubsztituált tetrahidro-[1,2,4]triazolo[4,5-a]pirimidin-4-on származékokat eredményeztek. A keletkezett termékek szerkezetét 2D NMR mérésekkel határoztuk meg, és javaslatot tettünk ezen új típusú gyűrűzárási reakció mechanizmusára [8].

### ***A munkatervben nem szereplő kutatások***

Lipták András akadémikus szénhidrátkémiai kutatócsoportjával évtizedek óta együttműködünk az általuk szintetizált vegyületek szerkezetének NMR módszerekkel történő igazolásában, térszerkezetük meghatározásában. Lipták akadémikus felkérésére ezúttal az általuk szintetizált, számos védett monoszaccharid-származék, nevezetesen naftilmetil-éterek, és az ezek felhasználásával szintetizált arabinogalaktán-típusú oligoszaccharid részletes NMR szerkezetvizsgálatát végeztük el. Ezen együttműködés eredményeképpen két közlemény született [4, 5]. Ezek a munkák – ha lazán is – kapcsolódnak pályázatunk szénhidrát résztematikájához, u.i. a nagyszámú molekula vizsgálata során összegyűlt tapasztalatokat jól tudtuk hasznosítani az általunk szintetizált molekulákkal kapcsolatban is. Ezért e közleményekben résztámogatásként hivatkoztunk jelen pályázatunkra is.